

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes  
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

2004 328

Int.Cl.<sup>3</sup>

3(51) C 12 N 9/52

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 K/ 2331 253

(22) 06.09.81

(44) 04.05.83

- (71) AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR, BERLIN, DD  
 (72) FLECK, WERNER, DR.HABIL.RER.NAT. DIPL.-BIOL.; PASSARGE, MARGRIT, DIPL.-BIOL.;  
 BIEBER, JOSEF, DR.RER.NAT.DIPL.-BIOL.; PRAUSER, HELMUT, DR.RER.NAT.DIPL.-BIOL.; DD;  
 (73) siehe (72)  
 (74) HULTSCH, ERICH INST. U. EINRICHTUNGEN DER ADW JENA, PATENTB. 6900 JENA  
 BEUTENBERGSTR. 11

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES PROTEOLYTISCHEN ENZYM-PRAEPARATES

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines proteolytischen Enzym-Präparates, das für die Chemotherapie von Erkrankungen des Menschen, für den Abbau eiweißhaltiger Verbindungen und den Aufschluß komplexer Substrate in der mikrobiologischen Industrie von potentielltem Nutzen ist. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines neuen proteolytischen Enzym-Präparates unter Verwendung eines Mikroorganismus, der bisher nicht für die Herstellung von Enzymen des Typs der Proteinasen herangezogen wurde. Der Mikroorganismus, Stamm ZIMET 43647, wird aufgrund seiner taxonomischen Eigenschaften als *Nocardiopsis dassonvillei* benannt. Ziel der Erfindung ist die Gewinnung eines proteolytischen Enzym-Präparates mit fibrinolytischen, Bioschlamm klärenden Eigenschaften sowie dem Vermögen, polypeptidhaltige Substrate der Fermentationsindustrie aufzuschließen, um die Palette derartiger Biokatalysatoren zu erweitern. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß durch aerobe Submersfermentation eines Mikroorganismus in Medien mit geeigneten C- N-Quellen und Mineralsalzen das Enzym gebildet, mit Methoden der Ultrafiltrationstechnik im Kulturfiltrat konzentriert und gegebenenfalls auf üblichem Wege lyophilisiert wird.

233125 3

1

#### Titel der Erfindung

Verfahren zur Herstellung eines proteolytischen Enzym-Präparates

#### Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines proteolytischen Enzym-Präparates, das aufgrund seiner fibrinolytischen Eigenschaften für die Humanmedizin, aufgrund seiner proteolytischen Wirkung für die Klärung von Bioschlamm und den Aufschluß komplexer Substrate in der Abwasser- und der mikrobiologischen Industrie von Nutzen ist. Insbesondere betrifft die Erfindung die Gewinnung einer Proteinase unter Verwendung eines bisher als Proteinase-Bildner nicht bekannten Mikroorganismus.

#### Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zahlreiche Vertreter der Gattungen Bacillus, Aspergillus und Streptomyces können unter geeigneten Fermentationsbedingungen Proteinasen synthetisieren, die sich bezüglich ihrer proteolytischen Eigenschaften auf Serin- (E. C. 3. 4. 21), Cystein- (E. C. 3. 4. 22), Aspartic- (E. C. 3. 4. 23) und Metallo-Proteinase (E. C. 3. 4. 24) unterscheiden. Häufig bilden die bekannten Proteinase-Bildner Gemische von Proteinasen, z. B. werden in diesem Falle alkalische und neutrale Proteinase simultan gebildet. Andererseits schränken die Art der Temperatur- und der pH-Optima bekannter proteolytischer Präparate deren Anwendungsmöglichkeiten ein.

Für bestimmte Anwendungszwecke ist wünschenswert, daß die proteolytische Aktivität eines Enzym-Präparates unter 30 °C sehr gering ist, dafür bei Temperaturen zwischen 35 und 70 °C voll zur Entfaltung kommt. Die Verwendung von mesophilen Ver-

tretern der Gattung Nocardiopsis als Proteinase-Bildner ist bisher nicht bekannt geworden. Es ist auch nicht bekannt, daß proteolytische Enzym-Präparate aus Nocardiopsis mit einem so hohen Temperatur-Optimum erhalten wurden, wie sie sonst nur von thermophilen Mikroorganismen, z. B. Thermoactinomyces, bekannt sind. Fermentationen mit letzteren sind dabei durch ein ungünstiges Verhältnis von Energieaufwand zu Enzymertrag gekennzeichnet.

#### Ziel der Erfindung

Die Erfindung dient der Herstellung eines proteolytischen Enzym-Präparates mit einem hohen Temperatur-Optimum mit Hilfe eines Mikroorganismus, der aufgrund seiner mesophilen Eigenschaften vom energetischen Standpunkt thermophilen Mikroorganismen vorzuziehen ist. Damit sollen die aufgeführten Nachteile bisher bekannter Verfahren zur Herstellung proteolytischer Enzym-Präparate vermieden und die Palette derartiger Präparate durch einen Vertreter mit breitem Anwendungsgebiet erweitert werden.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein technologisch einfaches Verfahren anzugeben, das es gestattet, aus leicht zugänglichen und billigen Einsatzstoffen in hohen Ausbeuten ein proteolytisches Enzym-Präparat mit hohem Temperatur-Optimum herzustellen, ohne auf thermophile Mikroorganismen zurückzugreifen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß unter aeroben und sterilen Kulturbedingungen in einem flüssigen Nährmedium mit Kohlenstoff- sowie Stickstoff-Quellen und Mineralsalzen der nachfolgende beschriebene Mikroorganismus oder seine Varianten gezüchtet werden.

Der Mikroorganismus, der in diesem Verfahren Anwendung findet, wurde unter der Registriernummer ZIMET 43647 in der ZIMET-Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen, Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der

Wissenschaften der DDR, 69 Jena, Beutenbergstraße 11, hinterlegt. Der Stamm ZIMET 43647 wird der Art Nocardiopsis dassonvillei (Brocq-Rousseau) Meyer (Int. J. Syst. Bacteriol. 26 (4): 487 bis 493 (1976)) zugeordnet. Er wurde aus verschimmeltem Stroh isoliert. Der Stamm ist aerob, Grampositiv und katalasepositiv. Er hat den Zellwandchemotyp III (meso-Diaminopimelinsäure. Arabinose und Galaktose fehlen). Mycolsäuren und Maltose fehlen. Das Substratmycel entwickelt sich bei 28 °C gut auf dem organischen Medium 79 (Prauser und Falta. 1968. Z. Allg. Mikrobiol. 8 (1): 39 bis 46) und auf den ISP-Medien 2, 3, 4 und 5 (Gottlieb und Shirling. 1966. Int. J. Syst. Bacteriol. 16 (3): 313 bis 340). Es ist nahezu farblos bis schwach gelblich-bräunlich (Medium 79). Oberflächlich liegende Substratmycelhyphen wachsen meist rechtwinklig zum Kolonierand nach außen. Von ihnen gehen mehr oder weniger rechtwinklige Verzweigungen aus. Lösliche Pigmente fehlen im Agar. Luftmycel wird am besten auf dem Medium 79 gebildet. Es ist mehlig, weiß mit schwach gelblich-gräulicher Tönung. Auf den anderen Medien wird Luftmycel nur an den Kolonierändern entwickelt oder die Luftmycelhyphen sind nur mit dem Mikroskop erkennbar. Die Luftmycelhyphen fragmentieren in länglichelliptische Sporen mit glatter Oberfläche. Stamm ZIMET 43647 bildet keine melanoiden Pigmente. Er reduziert Nitrate, peptonisiert Milch, verflüssigt Gelatine, hydrolysiert Stärke und baut Xanthin und Aeskulin ab. Der Stamm wächst auf D-Glukose, D-Mannose, Maltose, D-Mannit, D-Fruktose, Saccharose und Glyzerin. Er wächst nicht auf L-Arabinose, D-Xylose, L-Rhamnose, Lactose, Raffinose, Adonit, Dulcit und meso-Inosit. Das entgegen der Beschreibung von Meyer (loc.cit.) fehlende Wachstum auf Arabinose, Xylose, Lactose und Rhamnose wird beim gegenwärtigen Stand der taxonomischen Bearbeitung der Gattung Nocardiopsis nicht zum Anlaß genommen, eine neue Art dieser Gattung zu beschreiben.

Die Kultivierung des Stammes ZIMET 43 647 sowie seiner Mutanten und Varianten erfolgt unter aeroben Bedingungen. In Glucose-Gelatine lyophilisierte Mycelfragmente werden in geeignete Agarnährböden und nachfolgend in flüssige, vorher sterilisierte Nährmedien geimpft und das entstehende Mycel

wird in an sich bekannter Weise bei einer Temperatur zwischen 25 und 37 °C (vorzugsweise 28 °C) über einen Zeitraum von 2 bis 10 Tagen (vorzugsweise 6 Tagen) bei einer Acidität kultiviert, die zu Beginn des Fermentationsprozesses zwischen pH 6,5 und pH 7,2 liegt. Das Nährmedium besteht aus Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen, sowie aus anorganischen Salzen. Als Kohlenstoff-Quellen können Stärke, Glucose, Glyzerin, Mannit, Dextrin, Saccharose, Sojaöl und Sojamehl verwendet werden. Als Stickstoff-Quellen kommen außer den oben erwähnten stickstoffhaltigen Substraten auch Trockenhefe, Fleischpepton und Casein in Frage.

Gute Ergebnisse sind bei Zusatz von Mineralsalzen zu erzielen. Letztere begünstigen den Verlauf der Fermentation in Abhängigkeit vom eingesetzten Nährmedium. In komplexen Medien, die verschiedene Mehle enthalten, sind Zusätze von Kalziumkarbonat, Natriumnitrat bzw. Kaliumphosphat vorteilhaft. Die Fermentation des Bildners kann in Steilbrustflaschen und Rundkolben verschiedenen Inhalts, im Glasfermenter sowie in V2A-Tanks durchgeführt werden.

Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität der rohen Kulturbrothen des Stammes ZIMET 43 647 der Art Nocardioopsis dassonvillei und des daraus gewonnenen Enzym-Präparates E-ZIMET 43 647 erfolgte mit einer von M. Kunitz 1946 beschriebenen UV-spektroskopischen Methode (J. Gen. Physiol., 29, 149). Die Isolierung des proteolytischen Enzym-Präparates wird in der Weise durchgeführt, daß die Kulturlösung auf übliche Weise in Mycel und Kulturfiltrat separiert, das Kulturfiltrat mit Hilfe der Ultrafiltrationstechnik konzentriert und nachfolgend lyophilisiert wird.

Das lyophilisierte neue Enzym-Präparat ist eine bräunliche, amorphe Substanz, die sich gut in Wasser löst. Das proteolytische Enzym-Präparat wurde in seiner eiweißdegradierenden Wirksamkeit an verschiedenen Substraten untersucht. Das Präparat kann durch folgendes Substratprofil charakterisiert werden:

Substrate	Proteolytische Wirkung von E-ZIMET 43 647
-----------	--

Gelatine	+
Casein	+
Rinderserumalbumin	+
Gamma-Globulin	-
Kollagen	+
Fibrin	+

Das Temperaturoptimum des proteolytischen Enzym-Präparates E-ZIMET 43 647 liegt zwischen 35 und 70 °C (vorzugsweise bei 60 °C), wenn bei pH 7,6 als Substrat Casein bzw. Diazo-Casein verwendet wurde (Abb. 1). Das pH-Optimum liegt zwischen pH 6,0 und pH 10,0 (vorzugsweise pH 9,0), wenn als Temperatur 60 °C gewählt wurden (Abb. 2).

Die Thermostabilität des proteolytischen Enzym-Präparates E-ZIMET 43 647 wurde bei 35 und 60 °C für die Dauer von 6 Stunden bei pH 9,0 untersucht. Dabei zeigt sich, daß bei einer 2-stündigen Vorinkubation des Präparates bei 35 °C kein Aktivitätsabfall, nach 6stündiger Vorinkubation dagegen ein Abfall der proteolytischen Aktivität auf 90 % erfolgt.

Im Gegensatz dazu wird nach 2stündiger Vorinkubation des Präparates bei 60 °C bereits ein Abfall der proteolytischen Aktivität auf 35 % und nach 6stündiger Vorinkubation auf ca. 8 % beobachtet (Abb. 3).

Sowohl frische Fermentationslösungen des Bildners ZIMET 43 647 als auch das aus ihnen gewonnene Enzym-Präparat E-ZIMET 43 647 besitzen spezielle Eigenschaften zur Löslichmachung bzw. partiellen Hydrolyse von tierischen, pflanzlichen, aber auch menschlichen Proteinen. Daraus ergeben sich verschiedene Anwendungsgebiete in Landwirtschaft, Industrie und Humanmedizin.

Die proteolytische Wirkung des Präparates E-ZIMET 43 647 auf Gelatine wurde mit Hilfe der bei Täufer et al. (J. Chromat., 93, 487 bis 490, 1974) beschriebenen Methode bestimmt. Die Wirkung des Enzym-Präparates auf Casein wurde anhand der Methode

nach Kunitz (J. Gen. Physiol., 29, 149, 1946) ermittelt. Darüber hinaus ist die proteolytische Aktivität des Enzym-Präparates auch am Diazo-Casein nach einer üblichen Methode untersucht worden (J. Biol. Chem., 171, 501, 1947). Auch bei den Substraten Rinderserumalbumin und Gamma-Globulin ist die vorhandene oder fehlende proteolytische Wirkung von E-ZIMET 43 647 anhand der UV-spektroskopisch bestimmten Tyrosin-Freisetzung nach der Kunitz-Methode gemessen worden. Die proteolytische Wirkung des Enzym-Präparates auf Kollagen wurde mit Hilfe der Hide-Powder-Azur-Technik geprüft. Beim Hide-Powder-Azur ist jede freie Hydroxyl-Gruppe des Kollagens mit einem Farbstoffrest verbunden, so daß bei der enzymatischen Spaltung eines einzigen Moleküls eine große Zahl von Farbstoffmolekülen (Remazolbrilliantblau) in Lösung gehen. Dadurch wirkt Hide-Powder-Azur als "Verstärker-Substrat" (Rinderknecht et al., Clin. Chim. Acta, 21, 197 bis 203, 1968).

Die fibrinolytische Aktivität wurde mit Hilfe einer Fibrinagar-Plattentechnik nach Astrup und Müllertz (In: Gerinnungslaboratorium in Klinik und Praxis (Edit. E. Perlick und A. Bergmann, Verlag Georg Thieme-Leipzig, 1971, S. 374)) bestimmt.

#### Ausführungsbeispiele

1. Als Impfmateriäl für die Beimpfung einer Vorzucht-Kultur werden in Glukose-Gelatine lyophilisierte Mycelfragmente des Nocardiosis dassonvillei, Stamm ZIMET 43 647, verwendet. Als Vorzucht-Medium eignet sich ein flüssiges Nährmedium folgender Zusammensetzung:

Glukose	1,5 %
Sojamehl	1,5 %
CaCO <sub>3</sub>	0,1 %
NaCl	0,5 %
Leitungswasser. Sterilisation: 35 Min. bei 115 °C. Acidität zwischen pH 6,5 und pH 7,0	

Die Inoculum-Menge für 80 ml Vorzucht-Medium in einer 500 ml-Steilbrustflasche besteht aus 1 ml resuspendierten Mycelfragmente-Lyophilisats. Nach 2tägiger Vorzucht-

233125 3

- 7 -

Kultur bei 28 °C auf einem Schütteltisch mit einer Schwingfrequenz von 180/Min. werden 80 ml einer Produktions-Kultur in 500 ml Steilbrustflaschen mit 8 ml der Vorzucht-Kultur beimpft.

Als Produktions-Medium eignet sich ein flüssiges Nährmedium folgender Zusammensetzung:

Saccharose	0,25 %
NaNO <sub>3</sub>	0,2 %
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 %
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,05 %
KCl	0,05 %
FeSO <sub>4</sub>	0,001%

Aqua dest. Sterilisation: 35 Min. bei

115 °C Acidität zwischen pH 7,2 und pH 7,8

Die Fermentationsdauer beträgt 6 bis 10 Tage bei 28 °C auf einem Schütteltisch mit einer Schwingfrequenz von 180/Min., ehe die maximale proteolytische Aktivität erreicht wird.

2. Man geht wie im Beispiel 1 vor mit dem Unterschied, daß das Produktions-Medium folgende Zusammensetzung hat:

Sojamehl	2,0 %
Glukose	2,0 %
CaCO <sub>3</sub>	0,3 %
NaCl	0,5 %

In Leitungswasser. Sterilisation: 35 Min.

bei 115 °C. Acidität bei pH 6,5.

3. Das Verfahren unterscheidet sich von demjenigen des Beispiels 1 dadurch, daß das zur Beimpfung der Vorzucht-Kultur verwendete Impfmateriail auf einem festen Agarmedium folgender Zusammensetzung für die Dauer von 10 Tagen angezüchtet wird:

Glukose	1,0 %
Pepton	1,0 %
Hefe-Extrakt	0,2 %
Casamino acids	0,1 %
NaCl	0,6 %



Agar-Agar 1,5 %

Leitungswasser. Sterilisation: 35 Min. bei 115 °C. Acidität pH 7,0.

4. Das Verfahren unterscheidet sich von demjenigen des Beispiels 1 dadurch, daß eine 1. Vorkultur, wie in Beispiel 1 beschrieben, angelegt wird, nachfolgend jedoch eine 2. Vorkultur durch Beimpfen von 400 ml des Vorzucht-Mediums in 2l-Glasflaschen mit 10 ml Suspension aus der 1. Vorkultur für die Dauer von 24 Stunden gezüchtet wird.

400 ml der auf diese Weise erhaltenen 2. Vorkultur dienen zur Beimpfung von 20 l des im Beispiel 1 beschriebenen Produktions-Mediums, das in einem 32l-Glasfermenter enthalten ist. Während der Fermentation, die bei 28 °C mit einer Rührgeschwindigkeit von 400 U/Min. und einer Luftzufuhr von 15 l/Min. ausgeführt wird, kann die Schaumbildung durch Zusatz kleiner Mengen von Sonnenblumenöl oder silikonhaltiger Schaumschutzmittel kontrolliert werden. Die nach ca. 120stündiger Fermentationsdauer erhaltene Aktivität des proteolytischen Enzyms entspricht 0,9 bis 1,4  $\mu\text{mol}$  freigesetztes Tyrosin/ml im Überstand der Kulturlösung des Wildstammes.

5. Nach Abtrennen des Mycels aus der nach Beispiel 4 erhaltenen Fermentationslösung mittels Separator werden 20 l Kulturfiltrat durch Ultrafiltration auf 3,5 l konzentriert. Zur Ultrafiltration wird eine Eigenbau-Apparatur verwendet, die mit Zelluloseacetat-Membranen vom Typ UF 1 bestückt ist. Der Aufkonzentrierungsfaktor beträgt 5,7. Die je 1 ml native Kulturlösung gebildete proteolytische Aktivität bewirkt die Freisetzung von 0,9  $\mu\text{mol}$  Tyrosin in einer Caseinlösung nach 20 Minuten bei +60 °C. Die proteolytische Aktivität je 1 ml Konzentrat beträgt dagegen 4,0  $\mu\text{mol}$  freigesetztes Tyrosin unter gleichen Bedingungen. Der Aufkonzentrierungsfaktor bezüglich der Proteinaseaktivität beträgt 4,4. Die Enzymausbeute nach der Konzentrierung beträgt 77,7 % der Ausgangslösung. Die Filtrat-

233125 3 - 9 -

stromdichte erreicht einen Wert von 16 l pro Stunde und m<sup>2</sup> und die Selektivität  $\mathcal{S} = (1 - \frac{C_{\text{Filtrat}}}{C_{\text{Ausgangslösung}}}) \times 100 \%$  beträgt 67 %.

Nach der Ultrafiltration wird das proteolytische Enzym-Präparat lyophil getrocknet und bei -20 °C gelagert.

## Erfindungsanspruch

Verfahren zur Herstellung eines proteolytischen Enzym-Präparates auf mikrobiologischem Wege, gekennzeichnet dadurch, daß der Mikroorganismus Nocardiosis dassonvillei, Stamm ZIMET 43 647, unter aeroben Bedingungen in flüssigen Nährmedien, die eine Kohlenstoff- und Stickstoff-Quelle sowie Mineralsalze enthalten, bei einer Temperatur zwischen 25 und 37 °C während eines Zeitraumes von 5 bis 10 Tagen kultiviert wird und das dabei gebildete proteolytische Enzym E-ZIMET 43 647 im Kulturfiltrat mit Hilfe der Ultrafiltrationstechnik konzentriert und gegebenenfalls nachfolgend lyophilisiert wird.

Hierzu 3 Seiten Zeichnungen

233125 3

Einfluß der Temperatur auf die proteolytische  
Aktivität von E-ZIMET 43647

optische  
Dichte

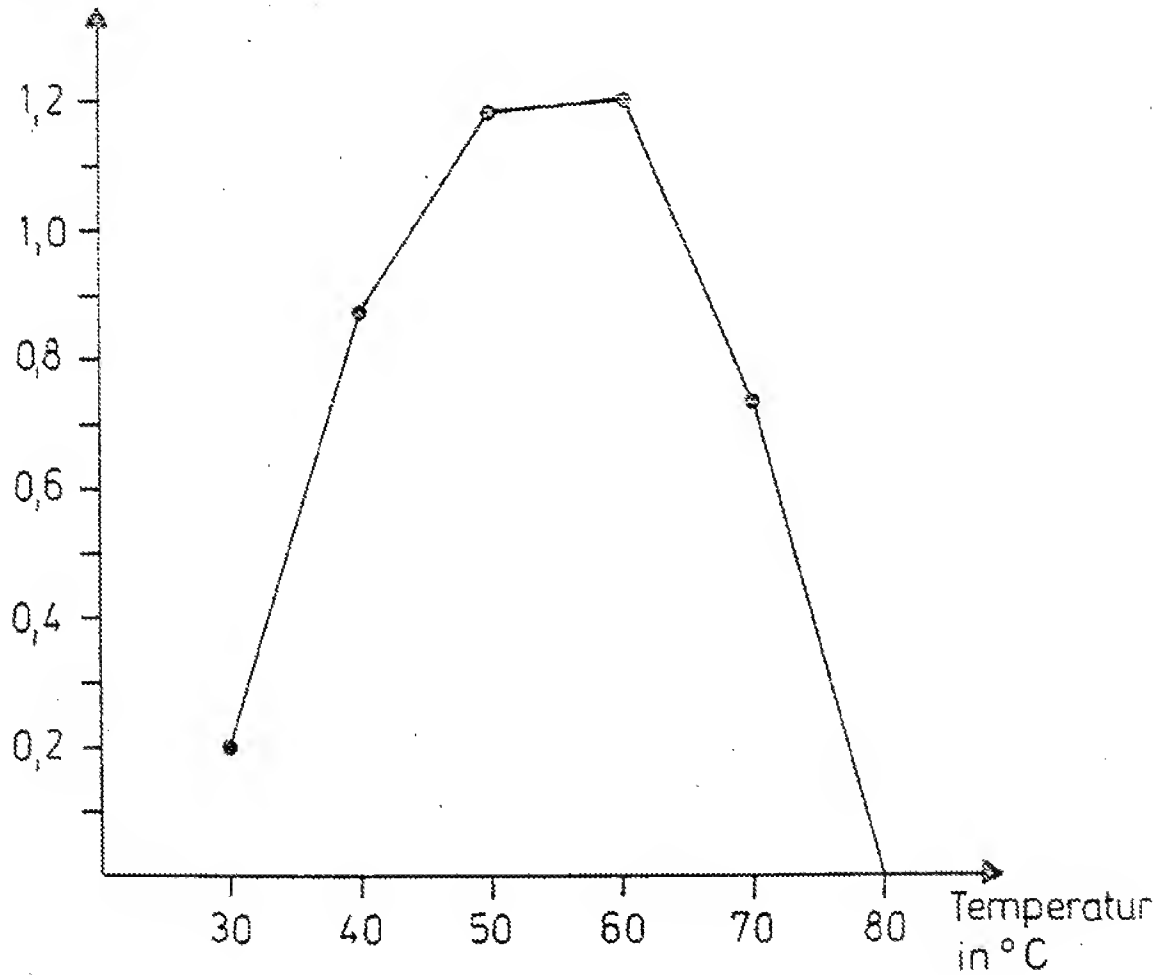


Abb.1 Temperatur-Wirkungsoptimum von E-ZIMET 43647

233125 3

Einfluß des pH-Wertes auf die proteolytische  
Aktivität von E-ZIMET 43647

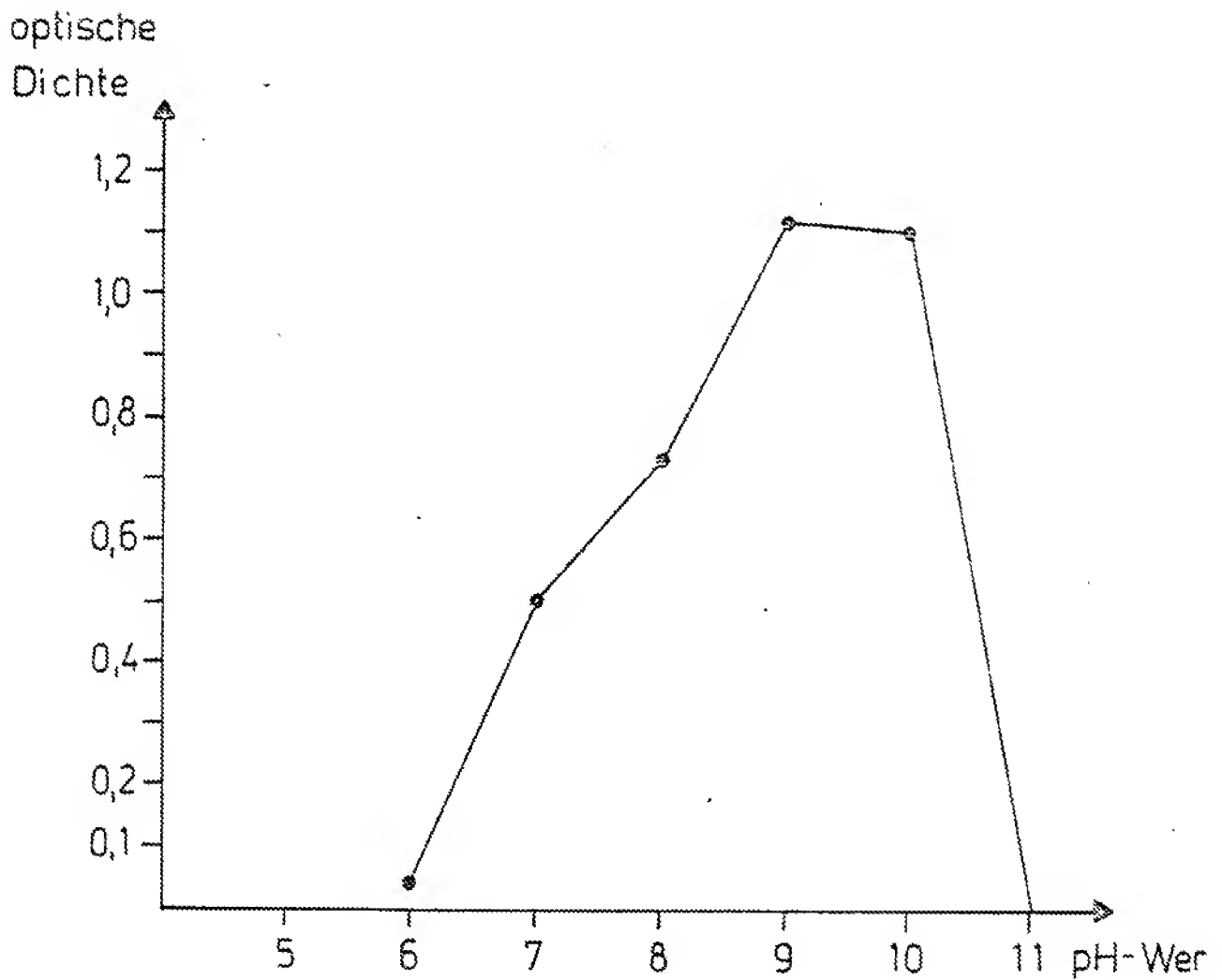


Abb.2 pH-Wirkungsoptimum von E-ZIMET 43647

233125 3

Thermostabilität von E ZIMET 43647  
bei 60°C — und 35°C ---

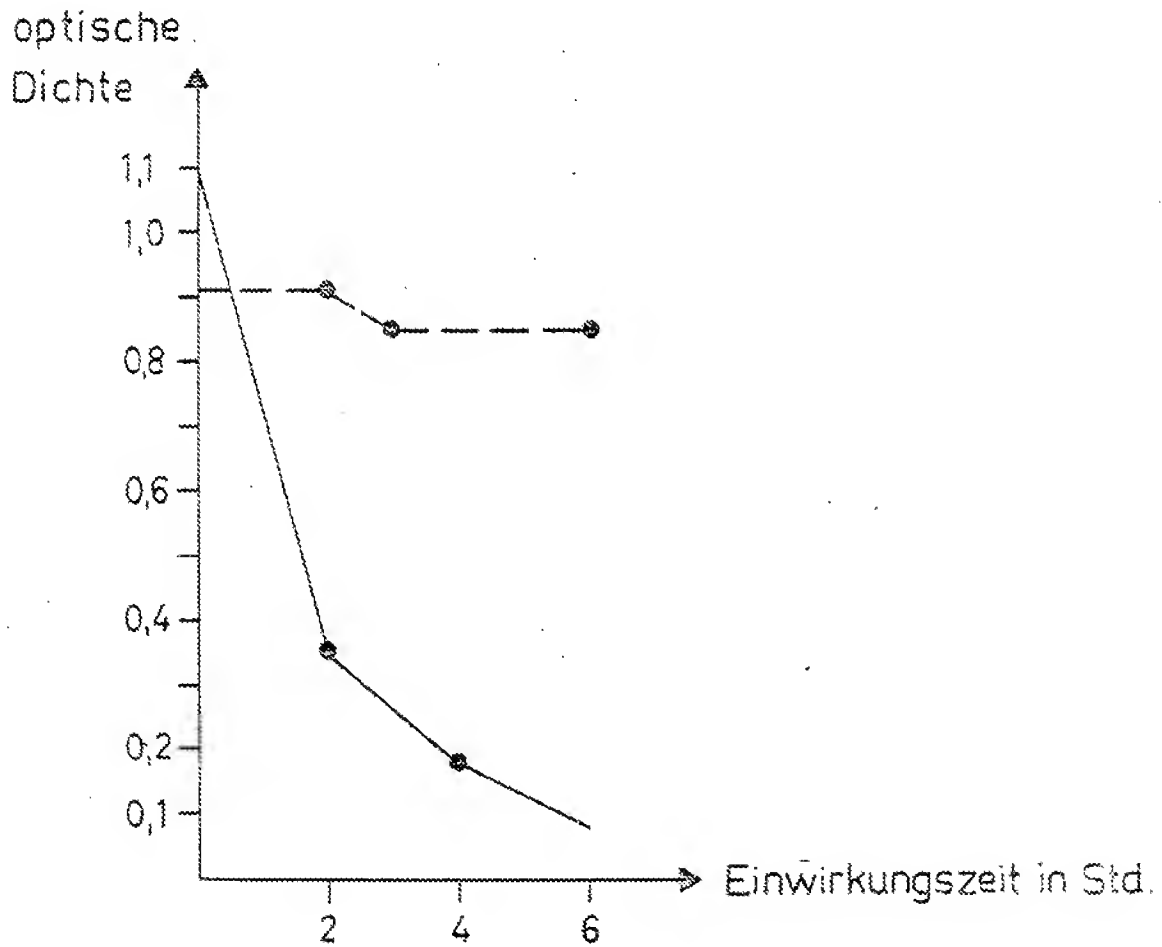


Abb.3 Einfluß der Temperatur auf die Aktivität  
von E-ZIMET 43647